Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg
Direktor: Professor Dr. med. R. Siegert

Versuche zur Isolierung eines definierten Polysaccharid-Antigens aus Zellinhalt von Candida tropicalis

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin des Fachbereichs Humanmedizin
der Philipps-Universität zu Marburg

vorgelegt von

Dieter Heinrich Sauerwein
aus Marburg (Lahn)

1972

Marburg 1971

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg
Direktor: Professor Dr. med. R. Siegert

Versuche zur Isolierung eines definierten Polysaccharid-Antigens aus Zellinhalt von Candida tropicalis

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin des Fachbereichs Humanmedizin
der Philipps-Universität zu Marburg

vorgelegt von

Dieter Heinrich Sauerwein
aus Marburg (Lahn)

Marburg 1971

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen von dem Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg/Lahn am. 22. Februar 1972
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches
Humanmedizin

Dekan: Prof. Dr. Oepen
Referent: Frau Priv.Doz. Dr. H.-L. Müller
Coreferent: Prof. Dr. R. Siegert

INHALTSVERZEICHNIS

I. Einleitung 1

II. Material und Methoden 4

A. Anzüchtung des Hefestammes 4

B. Antigengewinnung 4

1. Zellaufschluß und Gewinnung der Polysaccharide 4

2. Reinigung der Polysaccharide 5

3. Färbung der Polysaccharide 6

4. Säulenchromatographie 7

C. Hämagglutinationstest 8

D. Immunelektrophorese 9

E. Gewinnung von Immunseren 10

III. Ergebnisse 11

A. Polysaccharidfraktion aus dem Zellinhalt von Candida tropicalis 11

1. Ausschluß der Toxizität des Farbstoffes 11

2. Reinigung und Färbung der Polysaccharide 12

3. Immunisierungsversuche mit der gefärbten Polysaccharidfraktion 12

4. Prüfung der einzelnen Reinigungsschritte 13

B. Ungefärbtes, isoliertes Antigen aus dem Zellinhalt von Candida tropicalis 13

1. Isolierung des Einzelantigens 14

2. Immunelektrophoretische Identifizierung 20

3. Verhalten in der Agargel - Elektrophorese 20

4. Immunisierungsversuche mit dem isolierten Antigen 22

a) Antigen ohne Adjuvans 22

b) Antigen, an Latexpartikel gebunden 22

c) Antigen mit Freund'schem Adjuvans 25

C. Versuche zur Ermittlung des Molekulargewichtes durch Säulenchromatographie 25

1. Trennung an Sephadex G 200 25

2. Trennungsversuch an Sephadex G 100 28

D. Antigengemeinschaften mit anderen Hefen 29

IV. Diskussion 32

V. Zusammenfassung 37

VI. Literatur 39

I. EINLEITUNG

Die Einführung moderner Heilmittel wie Cystostatica, Hormone, Immundepressiva und insbesondere der Antibiotica hat zu einem erheblichen Anstieg sekundärer Mykosen, vor allem durch Sproßpilze geführt. Sekundäre Mykosen sind eine häufige Komplikation von Organtransplantationen. So beobachteten z.B. RIFKIND et al. (1967) bei 51 Nierentransplantationen 23 Mykosefälle, von denen die Hälfte durch Candida-Arten verursacht war. FOLB und TROUNCE (1970) haben gezeigt, daß die Zunahme endogener Mykosen unter Zytostatica und Corticosteriodbehandlung auf der Unterdrückung der zellulären Immunität beruhen dürfte. Während die verabreichten Prednisonpräparate - mit Ausnahme von Cyclophosphamid - keinen Einfluß auf die humoralen Antikörper gegen Candida-Hefen hatten, reduzierten sie jedoch deutlich die Transformationsrate von Lymphozyten gegenüber Candida albicans im Vergleich zu unbehandelten Kontrollpersonen. In Tierexperimenten wurde außerdem nachgewiesen, daß Corticosteroide auch die Phagozytose beeinflussen (MANKOWSKI, 1955; O'GRADY et al. 1964; SEELIG 1966). Am eindruckvollsten ist die Zunahme der sekundären Mykosen infolge der Antibioticatherapie. GERLOZCY et al. (1956) fand bei vergleichenden Untersuchungen

von 1939 bis 1956, also vor und während der Antibiotica-Ära, eine Zunahme des Hefebefalls von 50 %. - Postoperative Candida-Sepsis, hämatogene Nieren· infektionen mit Candida (BRAUDE und ROCK 1959; CONN et al. 1959; MATHIAS und REES 1956; RICHERT et al. 1959; VERGEZ und SIMON 1953) und Candida-Cholecystitis (AKIBA et al. 1965; LUTZ et al. 1957) dürften auf die präoperative Behandlung mit Breitbandantibiotica zurückzuführen sein, die eine Verschiebung des mikrobiellen Gleichgewichtes zugunsten der Hefen bewirken.

Infolge der zunehmenden Bedeutung der Candida-Mykosen gewinnt die serologische Diagnose der Sproßpilze an Interesse.

In aufwendigen, breitangelegten Untersuchungen gelang es TSUCHIYA et al. 1955, 1961, 1955), die Antigenstruktur der Zellwände von Sproßpilzen weitgehend aufzuklären. Er stellte durch Absorption von Candida-Immunseren mit intakten Zellen verschiedener Hefearten monospezifisch reagierende Seren her, die zur Serodiagnose von Sproßpilzarten geeignet sind. In der Routinediagnostik ist dieses Verfahren jedoch zu aufwendig, und die Haltbarkeit derart absorbierter Seren ist begrenzt.

Einfacher und auch zuverlässiger wäre die Verwendung

von monospezifischen Antiseren, die gegen isolierte Einzelantigene gerichtet sind. PRIEBE (1967) konnte mit Hilfe der Gelfiltration aus dem gefärbten Gemisch Phenol-Wasser extrahierter Candida-Antigene eine serologisch aktive Fraktion gewinnen, die in der Immunelektrophorese als Einzelantigen reagierte. Es soll in dieser Studie geprüft werden, ob sich ein entsprechendes Antigen aus Candida tropicalis gewinnen läßt, das zur Herstellung eines spezifischen Testserums geeignet ist.

II. MATERIAL und METHODEN

A. Anzüchtung des Hefestammes

Für die Versuche wurde die imperfekte Hefe Candida tropicalis (Castellani) Berkhout, Stamm CBS 94 (Centraalburau voor Schimmelcultures, Baarn/Delft), der in Glattform vorlag, verwendet.

Von Schrägagarröhrchen sind die Hefen zur Vorkultur auf Petrischalen mit Sabouraud-Maltose-Agar (Difco) überimpft worden. Die Vorkultur wurde mit physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt, auf Roux-schalen mit Sabouraud-Maltose-Agar übertragen und bei 30°C 48 Stunden lang bebrütet. Der Zellrasen wurde mit physiologischer Kochsalzlösung von den Platten abgeschwemmt. Zur Entfernung restlicher Nährbodenbestandteile folgte nach dem Zentrifugieren der Zellsuspension (15 Minuten bei 14 000 g) ein dreimaliges Auswaschen des Sediments mit physiologischer Kochsalzlösung.

B. Antigengewinnung

1. Zellaufschluß und Gewinnung der Polysaccharide

Das Material wurde in einem Zellhomogenisator (Modell

MKS, Braun, Melsungen) mittels Glaskugeln von 0,5 mm Durchmesser in 3,5 min bei 4000 Upm unter Kühlung mit Kohlensäureschnee homogenisiert.

Durch Zentrifugieren (1500 Upm = 7000 g, 10 min) konnte der Zellinhalt von den Wänden getrennt und als Überstand abpipettiert werden.

Die Aufarbeitung der Polysaccharide aus dem Zellinhalt erfolgte mit der Phenol-Wasser-Extraktion nach WESTPHAL et al. (1952) bei 67°C. In der wässrigen Phase enthaltene Phenolreste wurden durch Dialyse gegen Wasser (Dialysis Tubing, Visking, Company, Division of Union Carbide Corporation, Chicago) entfernt. Der Inhalt des Dialyseschlauches wurde in der 6-fachen Menge Alkohol unter Zusatz von Natriumacetat gefällt. Ein Teil der so gewonnenen Substanz diente in wässriger Lösung als Antigen zur Immunisierung von Kaninchen und für die Immunelektrophorese.

2. Reinigung der Polysaccharide

Der aufbereitete Antigenextrakt aus dem Zellinhalt von Candida tropicalis bestand im wesentlichen aus Polysacchariden. Er enthielt außerdem noch Spuren von Eiweiß und Nukleinsäuren, die entfernt werden mußten, weil sie sich bei Färbung der Polysaccharide mitgefärbt hätten.

Dazu wurde die wässrige Phase der Phenol-Wasser-Extraktion in einer Verdünnung von 10 : 1,5 mit 20 %-iger Sulfosalizylsäure versetzt. Die gefällten Eiweiße ließen sich danach abzentrifugieren. Die Sulfosalizylsäure wurde durch Dialyse gegen Wasser entfernt, solange, bis eine Prüfung mit $FeCl_3$ keine Rotfärbung mehr zeigte.

Zur Fällung der Nukleinsäuren wurde das Dialysat mit N-Cethyl-N,N,N-trimethylammoniumbromidlösung versetzt (Endkonzentration 1 %) und nach einstündiger Einwirkungszeit bei $4^{o}C$ zentrifugiert. Zum Entfernen des Fällungsmittels wurde der Überstand mit der 6-fachen Menge einer 0,1 molaren aethanolischen Natriumacetatlösung versetzt, und anschließend der Niederschlag durch mehrmaliges Auswaschen mit Aethanol von Natriumacetat befreit. Dann erfolgte eine Extraktion des in Wasser resuspendierten Niederschlages (10 %-ig) nach MARKOWITZ und HENDERSON (1958), um letzte Reste von Eiweiß und Nukleinsäuren zu entfernen. Dazu wurde die wässrige Lösung zu gleichen Teilen mit 1,2,2-Trifluor-1,1,2-trichloraethan versetzt, gerührt, anschließend 3 min bei 4500 Upm zentrifugiert, die wässrige Phase abpipettiert und gefärbt.

3. Färbung der Polysaccharide

Nach BÜRGER und MÜLLER (1964) ist zum Färben der

Polysaccharide der Vinylsulfonfarbstoff Remazol-türkisblau G (Farbwerke Hoechst) gut geeignet. Die verwendete Farbstofflösung setzte sich zusammen aus 0,05 g Remazoltürkisblau G in 1 ml Wasser, 0,33 ml 30 %-iger NaOH und 2,17 ml 20 %-iger NaCl-Lösung. Zum Färben wurde eine 1 %-ige Polysaccharidlösung mit der Farbstofflösung im Verhältnis 10 : 1,25 gemischt, 2 Stunden im Wasserbad bei 40°C inkubiert, und der Färbeprozeß nach 2 Stunden durch Zugabe von 0,1 n Schwefelsäure abgebrochen, um eine Polymerisation der Farbstoffmoleküle untereinander zu verhindern. Alle Polysaccharide waren zu diesem Zeitpunkt angefärbt. Der überschüssige Farbstoff konnte durch Gelfiltration an Sephadex G 25 von der markierten Substanz getrennt werden.

4. Säulenchromatographie

Die gefärbten, vom überschüssigen Farbstoff gereinigten Polysaccharide wurden auf eine Sephadex G 200-Säule (Pharmacia, Uppsala) aufgetragen und mit Wasser eluiert. Das Eluat wurde in Portionen zu 5 ml in einem Fraktionssammler (LKB, Radi-Rac) aufgefangen. Die chromatographische Aufzeichnung erfolgte in einem Durchflußphotometer (LKB, Unicord I) bei einer maximalen Absorption von 366 nm.

Die Papiervorschubgeschwindigkeit des Schreibers (LKB, Recorder Typ 6520 A) betrug 20 mm pro Stunde; nach je 20 ml Elutionsvolumen erfolgte ein Farbbandwechsel, der an der Kurve jeweils durch einen Punkt markiert wurde. Die langsam wandernde Fraktion wurde isoliert, immunelektrophoretisch auf Reinheit kontrolliert und gesammelt.

C. Hämagglutinationstest

Im Hämagglutinationstest wurden Schaferythrozyten (0,1 ml Erythrozytensediment) mit Vollantigen in 1 ml physiologischer Kochsalzlösung sensibilisiert. Nach einer Einwirkungszeit von 2 Stunden bei 37°C im Wasserbad wurde das Sediment gewaschen und mit physiologischer Kochsalzlösung auf eine 1 %-ige Suspension gebracht. Die Prüfung des Antikörpergehaltes der Antiseren erfolgte durch Inkubation von an unbehandelte Erythrozyten absorbierte Immunseren in Verdünnungsreihen mit sensibilisierten Blutkörperchen (0,2 ml Serumverdünnung und 0,2 ml Erythrozytensuspension). Als Träger dienten Prestware-Hämagglutinationsplatten. Zur Kontrolle wurde die stärkste Serumkonzentration mit nicht sensibilisierten Blutkörperchen versetzt. Abgelesen wurde nach einer Einwirkungszeit von 2 Stunden im Wasserbad bei 37°C

und 18 Stunden im Kühlschrank bei ca. 4°C.

D. Immunelektrophorese

Die Immunelektrophorese erfolgte in Anlehnung an GRABAR und WILLIAMS (1955), modifiziert nach SCHEIDEGGER (1955), im Immunophor (LKB). Als Trägergel diente Difco Agar "Special Noble", als Puffer der von MICHAELIS angegebenen Diäthylbarbitursäurepuffer mit einem pH-Wert von 8,2 und einer Ionenstärke von 0,1 m. Eine 1,2 %-ige Agarlösung wurde mit einem Gemisch von Wasser und Puffer im Verhältnis 1:1 hergestellt, 15 min im siedenden Wasserbad erhitzt und anschließend auf die Objektträger gegossen. In die erstarrte Schicht wurden Löcher und Gräben gestanzt. In die Stanzlöcher kam je ein Tropfen der Antigene. Dann folgte die Elektrophorese bei 250 Volt (10V/cm) 1 Stunde lang. Hierauf wurde das Immunserum in den Graben eingefüllt und bis zur vollständigen Entwicklung der Präzipitationslinien in einer feuchten Kammer 24 bis 48 Stunden lang inkubiert. Das nichtgebundene Eiweiß wurde durch 12-stündiges Spülen der Objektträger mit physiologischer Kochsalzlösung entfernt. Nach Trocknung mit Filterpapier wurden die Präzipitate mit einer 0,5 %-igen Lösung von Amidoschwarz 10 B (Merck, Darmstadt) in Methanol-Eisessig angefärbt.

E. Gewinnung von Immunseren

Nach einer Sterilitätsprüfung der antigenen Lösungen erfolgte die Immunisierung von Kaninchen (Bastarde von ca. 2,5 bis 3,0 kg) durch Injektion in die Ohrvenen. Zuvor wurde das Tierserum im Hämagglutinationstest auf etwa schon vorhandene Antikörper gegen Candida tropicalis untersucht. Die Versuchstiere erhielten die Antigeninjektionen in der ersten Woche täglich, in steigenden Dosen von 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 ml, in der zweiten und dritten Woche nur noch an jedem zweiten Tag 2,0 ml. Eine Woche nach der letzten Injektion wurden die Antikörper im Hämagglutinationstest bestimmt. Bei niedrigem Titer erfolgte noch eine Nachimmunisierung, indem 3 mal 2,0 ml an jedem 2. Tag intravenös injiziert wurde. Mäusenvon ca. 25 g wurden nach dem gleichen Immunisierungsschema die Antigene in die Schwanzvenen injiziert.

III. E R G E B N I S S E

A. Polysaccharidfraktion aus dem Zellinhalt von Candida tropicalis

Zur Gewinnung eines Einzelantigens wurde die von PRIEBE (1967) an gereinigten und gefärbten Polysacchariden aus dem Zellinhalt von Candida tropicalis erarbeitete Methode angewandt. Die von Eiweiß und Nukleinsäuren gereinigten Polysaccharide aus dem Zellinhalt von Candida tropicalis, gefärbt mit Remazoltürkisblau G, boten sich zunächst zur Immunisierung an. Es mußte jedoch vorher geprüft werden, ob der Farbstoff für die Versuchstiere möglicherweise toxisch sei.

1. Ausschluß der Toxizität des Farbstoffes

Zum Ausschluß einer die Immunisierung störenden Giftwirkung des Farbstoffes Remazoltürkisblau G wurden 6 Mäusen und einem Kaninchen wässrige Farbstofflösungen in hundertfacher Konzentration der späteren Versuche intravenös injiziert. Die Tiere blieben gesund. Nach vier Wochen wurden die Tiere getötet und seziert. Der Farbstoff war in Leber und Milz gespeichert und makroskopisch sichtbar.

2. Reinigung und Färbung der Polysaccharide

Das nach Anzucht und Homogenisierung gewonnene Material wurde, wie beschrieben, in Zellinhalt und -wände getrennt. Da sich auch Proteine und Nukleinsäuren mit Vinylsulfonfarbstoffen anfärbten, mußten sie vor Färbung der Polysaccharide aus dem Extrakt entfernt werden. Bei der Eiweißfällung mit Sulfosalizylsäure machte der Niederschlag ca. 50 % des Extraktes aus nach Abtrennung der Nukleinsäuren betrug der Substanzverlust ca. 60 % des Ausgangsmaterials aus der Phenol-Extraktion. Nach Färbung der gereinigten Polysaccharide und Entfernen des überschüssigen Farbstoffes wurde ein kleiner Teil der Lösung zur Säulenchromatographie abgezweigt, der größte Anteil jedoch autoklaviert und nach Sterilitätskontrolle zur Immunisierung verwandt.

3. Immunisierungsversuch mit der gefärbten Polysaccharidfraktion

Zur Klärung der Frage, ob die Aufarbeitung des Zellinhaltes die Antigenität verändert, wurden zwei Kaninchen und 15 Mäuse mit der gereinigten, gefärbten Polysaccharidfraktion gespritzt. In der Injektionslösung befanden sich 18,2 mg gereinigte Polysaccharide/ml und 0,6 mg Remazoltürkis-

blau G/ml. Auch nach 6-wöchiger Behandlung ließen sich Antikörper weder mit Hilfe des Hämagglutinationstestes, noch mit Hilfe der Immunelektrophorese im Serum der Versuchstiere nachweisen. Ein Kontrolltier, das mit Vollantigenlösung gleicher Konzentration behandelt wurde, zeigte hingegen schon nach 3 Wochen einen deutlichen Antikörpertiter.

4. Prüfung der einzelnen Reinigungsschritte

Da bei der Abtrennung von Proteinen und Nukleinsäuren viel Material verloren ging, wurde geprüft, inwieweit dabei auch serologisch aktive Bestandteile mitgefällt wurden. Die Immunelektrophorese zeigte, daß in den verworfenen Produkten aller Reinigungsschritte noch antigene Substanzen enthalten waren. Die verschiedenen Fällungsrückstände wiesen die gleichen Präzipitationslinien auf wie die Fraktionen des ersten Gipfels im Durchflußchromatogramm der gefärbten, gereinigten Polysaccharide (vgl. Abbildung 3).

B. Ungefärbtes, isoliertes Antigen aus dem Zellinhalt von Candida tropicalis

Da die Versuchstiere nach Injektion von gefärbten

Polysaccharidgemischen keine Antikörper gebildet hatten (siehe Abbildung 15), konnte auf einen Immunisierungsversuch mit isoliertem, gefärbten Antigen verzichtet werden. Da die Antigene mittels Immunelektrophorese aber noch nachgewiesen werden konnten, mußten die für die spezifische Immunisierung notwendigen Eigenschaften offenbar bei der Reinigung verlorengegangen sein. Es wurde daher nach einem schonenderem Aufarbeitungsweg gesucht, der noch eine Identifizierung der Polysaccharide ermöglichen sollte. Das Verfahren bestand darin, daß auf eine Anfärbung der Polysaccharide verzichtet und zur Identifizierung die natürliche Eigenabsorption bei 253 nm verwandt wurde. Damit entfiel die Abtrennung der Eiweiße und Nukleinsäuren.

1. Isolierung des Einzelantigens

Es wurde nun versucht, mit der vereinfachten Aufarbeitung zu dem Polysaccharidantigen zu gelangen, das immunelektrophoretisch dargestellt worden war. Das nach der Methode von WESTPHAL (1952) durch Phenol-Wasser-Extraktion erhaltene Antigengemisch wurde in wässriger Lösung direkt in 5 ml Portionen auf eine mit Sephadex G 200 gefüllte Säule aufgetragen. Als Elutionsmittel diente destilliertes Wasser. Das Durchflußdiagramm bei einer maximalen

Absorption von 253 nm ist in Abbildung 1 dargestellt. Es zeigt 2 deutliche Gipfel. Der erste (A) stellt die Ausschlußfraktion dar. Die Schulter, die auch bei allen Parallelversuchen bestand, weist darauf hin, daß diese Fraktion nicht einheitlich war. Der zweite Gipfel (B) repräsentiert eine Fraktion mit kleinerem Molekulargewicht. Beide isolierte Fraktionen wurden immunelektrophoretisch geprüft. Die Resultate sind in Abbildung 2 gegenübergestellt.

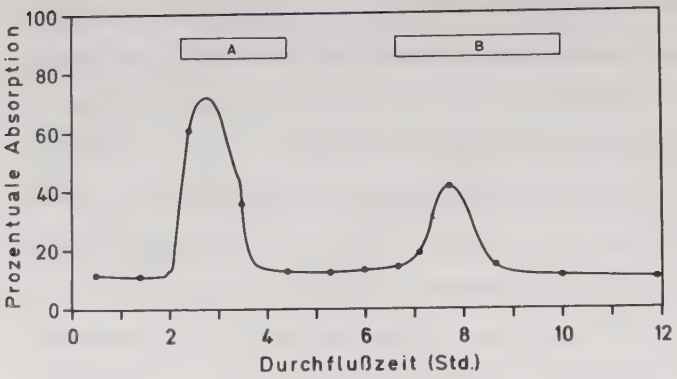

Abbildung 1: Säulenchromatographische Trennung des Zellinhalts aus Candida tropicalis nach Phenol-Wasser-Extraktion. Säulenfüllung Sephadex G 200. Elutionsmittel Wasser. Absorption bei 253 nm.

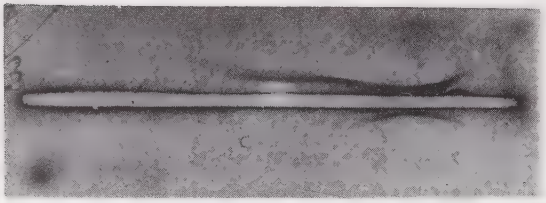

Abbildung 2: Immunelektrophorese mit isolierten Fraktionen A (oben) und B (unten), entsprechend Abbildung 1, und Antiserum gegen Candida tropicalis.

Die Präzipitate zeigen, daß in der Fraktion A mehrere Antigene und zusätzlich die serologische Aktivität aus Fraktion B enthalten waren. Die isolierte Fraktion B führte immunelektrophoretisch mit dem gleichen Antiserum nur zu einer Präzipitatlinie und stellte somit vermutlich ein Einzelantigen dar.

In Abbildung 3 werden Absorptionskurven nach säulenchromatographischer Auftrennung von Phenol-Wasser-Extraktion des Zellinhaltes von Candida tropicalis an Sephadex G 200 verglichen. Während die unterbrochene Linie das Durchlaufchromatogramm des gefärbten Polysaccharidgemisches darstellt, gibt die ausgezogene Kurve das Verhalten des ungereinigten und ungefärbten Extraktes wieder. Diese Kurve wurde aus Abbildung 1 durch Umrechnung der Abszissenwerte von Durchflußzeit auf Durchflußvolumen und der Absorptionsmeßdaten in Extinktion erhalten. Die Gegenüberstellung zeigt deutlich, daß beide Maxima gut übereinstimmen. Berücksichtigt man, daß die Extinktion des gereinigten Extraktes nur 1/3 derjenigen des ungereinigten beträgt, so läßt sich die unterschiedliche Breite beider Gipfelpaare erklären. Wegen der einheitlichen Position der Gipfel muß man annehmen, daß die Fraktion B aus dem schonender und vereinfacht aufgearbeiteten

Extrakt der Polysaccharid-Fraktion des gefärbten Extraktes entspricht. Der zusätzliche Gipfel des gefärbten Extraktes im Bereich der 20. bis 30. Fraktion ist möglicherweise auf Änderung der Molekülgrößen durch Reinigungs- und Färbungsverfahren zurückzuführen.

Beim Auftragen von 100 mg Trockensubstanz in wässriger Lösung (5 ml) befanden sich im ersten Gipfel (Elutionsvolumen 60 ml) 83,9 mg, in der Fraktion des zweiten Gipfels (Elutionsvolumen 80 ml) 15,7 mg Trockensubstanz. Die 200 ml des Nachlaufs und der Fraktionen zwischen beiden Gipfeln enthielten nur 0,3 mg Trockensubstanz.

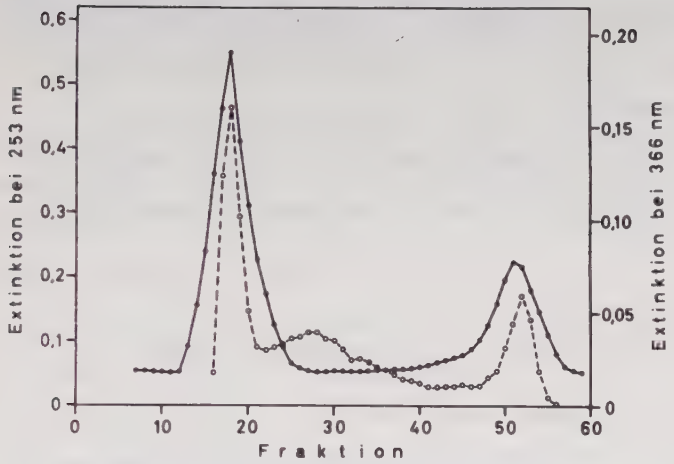

Abbildung 3: Vergleich der zeitabhängigen Absorptionskurven von säulenchromatographisch gewonnenen, mit Remazoltürkisblau G angefärbter Polysaccharide-Fraktionen

o - - o (gemessen bei 366 nm) und der wässrigen Phase der Phenolextraktion ●——● (gemessen bei 253 nm). Säulenfüllung Sephadex G 200. Elutionsmittel Wasser. Schreibgeschwindigkeit 20 mm/h.

2. Immunelektrophoretische Identifizierung

Die Immunelektrophoresen der korrespondierenden Fraktionen beider Aufarbeitungsmethoden zeigten, wie zu erwarten, ein übereinstimmendes Bild (Abbildungen 4 und 5). Alle Fraktionen des B-Gipfels, die nach der vereinfachten Aufarbeitung anfielen, wurden durch immunelektrophoretische Kontrolle auf ihre Reinheit geprüft, gesammelt und zur Immunisierung von Kaninchen verwandt.

3. Verhalten in der Agargel-Elektrophorese

Die durch Säulenchromatographie des Phenol-Wasser-Extraktes gewonnene Fraktion B wurde eine Stunde lang in der Agargel-Elektrophorese aufgetrennt. Die übliche Fixierung mit Methanol-Eisessig-Wasser (9:1:10), die wir bei Proteinen und Glycoproteinen mit gutem Erfolg anwendeten, gelang nicht. Erst durch Behandlung mit 90 %-igem Aethylalkohol konnte eine schmale, zur Kathode wandernde Bande im Agargel fixiert werden, die in ihrer Lage dem Präzipitationsbogen in der Immunelektrophorese entsprach. Diese Bande ließ sich nur durch PAS anfärben.

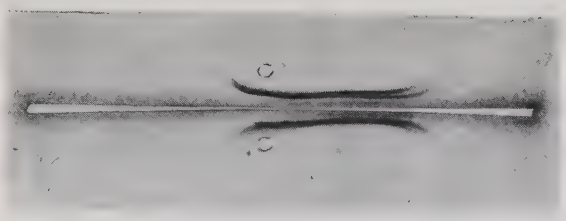

Abbildung 4: Immunelektrophoretisches Verhalten der beiden Ausschlußfraktionen des Zellinhaltes von Candida tropicalis
Oben: gefärbte Polysaccharide
Unten: ungefärbte Polysaccharidfraktion
Antiserum gegen Candida tropicalis

Abbildung 5: Immunelektrophoretisches Verhalten der beiden isolierten Antigenfraktionen des Zellinhaltes von Candida tropicalis
Oben: gefärbtes Polysaccharid
Unten: ungefärbte Polysaccharidfraktion
Antiserum gegen Candida tropicalis

4. Immunisierungsversuche mit dem isolierten Antigen

a) Antigen ohne Adjuvans

Ein Kaninchen wurde mit den gesammelten, isolierten Fraktionen immunisiert, nachdem die Injektionslösung autoklaviert und auf Sterilität geprüft worden war. Ein zweites Tier wurde zur Kontrolle mit dem rohen Zellinhalt von Candida tropicalis behandelt. Während von der 3. Woche ab bei dem Kontrolltier Antikörper in der Immunelektrophorese und im Hämagglutinationstest nachweisbar waren, trat selbst nach Gaben von insgesamt 600 mg Trockensubstanz des Eluats im Verlauf von 7 Wochen kein Antikörpertiter im Serum auf.

b) Antigen, an Latex gebunden

Da, wie der vorhergehende Versuch vermuten läßt, das isolierte "Antigen" nur Haptencharakter besaß, sollte geprüft werden, ob das Polysaccharid auf Latexpartikeln als Trägermaterial zur Immunisierung besser geeignet ist. Deshalb wurden 0,3 ml der Fraktion B (= 10 mg Trockensubstanz) mit 0,1 ml einer 10 %-igen Latexlösung (Latexpartikel Difco in einer Größe von 81 nm) in einem Glykol-Puffer (pH- 8,2) 15 Minuten lang inkubiert. Das Antigen war tatsächlich an die Latexpartikel gebunden, wie

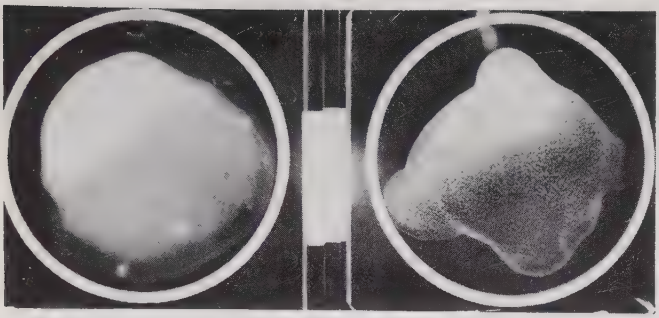

Abbildung 6: Latex-Test

Rechts: Reaktion von Antigen auf Latexpartikeln mit Antiserum gegen Candida tropicalis

Links: Ausbleibende Reaktion von Latexpartikeln mit Antiserum gegen Candida tropicalis

die deutliche Agglutination durch ein Antiserum gegen Candida tropicalis beweist. Die Kontrolle, bei der statt "Antigen" physiologische Kochsalzlösung verwandt wurde, zeigte keine Agglutinationsreaktion mit dem Antiserum (Abbildung 6). Auch die Gegenkontrolle mit antigenbeladenen Partikeln in physiologischer Kochsalzlösung war negativ.

Nun wurden Immunisierungsversuche mit sensibilisierten Latexpartikeln durchgeführt. In einem Vorversuch wurde zunächst die Verträglichkeit der Latexpartikel geprüft. Zu diesem Zweck erhielt ein Kaninchen nach dem in der Methodik angegebenen Immunisierungsschema 19 ml einer 10 %-igen Latexsuspension im Verlauf von 3 Wochen intravenös injiziert, ohne daß eine Unverträglichkeit zu erkennen war. Es wurden nunmehr 400 mg der isolierten Fraktion B an Latex gebunden. Nach einer Agglutinationskontrolle mit einem hochtitrigen Antiserum wurde ein Kaninchen mit Antigen-Latexsuspension intravenös behandelt. Es gelang selbst nach 5-wöchiger Versuchsdauer nicht, einen spezifischen Antikörper in der Immunelektrophorese und im Hämagglutinationstest nachzuweisen. Bei einem Kontrolltier, das mit Vollantigen aus Candida tropicalis in entsprechender Weise behandelt wurde, traten Antikörper auf.

c) Antigen mit Freund'schem Adjuvans

Einem weiteren Tier wurden viermal im Verlauf von 6 Wochen je 50 mg Substanz aus der isolierten Fraktion zusammen mit je 0,5 ml Freund'schem Adjuvans (Difco) intramuskulär injiziert. Auch in diesem Fall blieb eine Antikörperbildung aus.

C. Versuche zur Ermittlung des Molekulargewichtes durch Säulenchromatographie

1. Trennung an Sephadex G 200

Auf einer Sephadex G 200-Säule wurden ein Gemisch aus dem hochmolekularen Stoff Dextran 2000 (Dextranblau, Pharmacia, Uppsala), aus Methylorange ($C_{14}H_{14}NaO_3S$) und dem mit Phenol-Wasser extrahierten Zellinhalt von Candida tropicalis aufgetragen. Als Elutionsmittel diente Wasser. Die Fraktionen wurden in 5 ml Portionen aufgefangen. Die Registrierung erfolgte im Durchflußphotometer bei einer Absorption von 253 nm, einem Wellenbereich, in dem außer dem Eluat auch die Farbstoffe absorbieren.

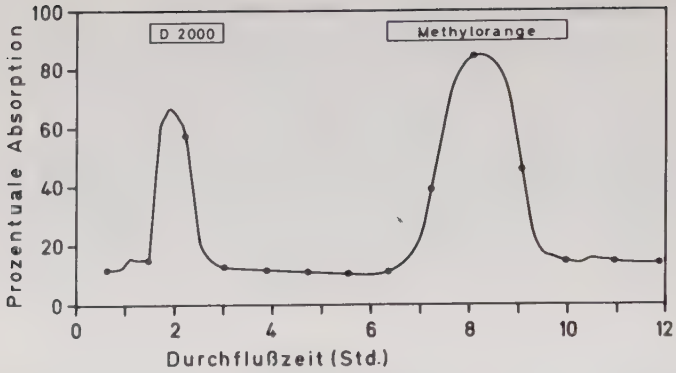

Abbildung 7: Säulenchromatographische Trennung der wässrigen Phase einer Phenolextraktion aus Zellinhalt von Candida tropicalis, vermischt mit Dextran D 2000

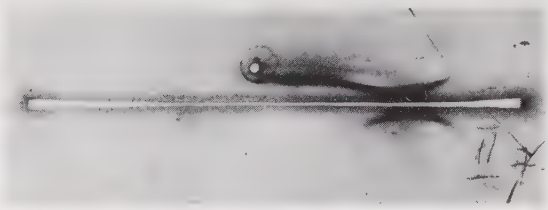

Abbildung 8: Immunelektrophorese der isolierten Fraktionen mit Dextran D 2000 (oben) und Methylorange (unten), entsprechend Abbildung 7. Antiserum gegen Candida tropicalis.

Die Abbildung 7 gibt das Durchflußdiagramm wieder. Die einzelnen Markierungspunkte deuten je 20 ml Elutionsvolumen an. Wie in Abbildung 1 sind auch hier zwei deutliche Maxima zu erkennen, wobei die Position des zweiten Gipfels übereinstimmt.
Aus der Übereinstimmung der Gipfel B, der Präzipitate mit und ohne Methylorange, sowie aus der Tatsache, daß die Fraktionen B mit Methylorange intensiv angefärbt waren, kann man den Schluß ziehen, daß das isolierte Antigen und Methylorange in der gleichen Fraktion gewandert waren. Die Ausschlußfraktion erschien durch das gefärbte Dextran blau.
Beide Fraktionen wurden immunelektrophoretisch überprüft, und die Ergebnisse in Abbildung 8 gegenübergestellt. Im oberen Auftragspunkt wurde das Eluat der Fraktion, die mit dem hochmolekularen Dextran D 2000 vermischt war, im unteren die mit Methylorange vermischte Fraktion, die dem zweiten Maximum entspricht, aufgetragen. Das daraus resultierende immunelektrophoretische Bild (Abbildung 8) gleicht dem ohne markierende Substanzen.
Das Dextran erschien in der Ausschlußfraktion und Methylorange mit der Fraktion B. Aus diesem Verhalten kann der Schluß gezogen werden, daß das isolierte Antigen (Fraktion B) ein kleineres Molekulargewicht als 200.000 hat.

2. Trennungsversuch an Sephadex G 100

Wie der vorhergehende Versuch eindeutig bewies, liegt der auf Sephadex G 200 abgetrennte Komplex, der die immunelektrophoretische Aktivität eines Einzelantigens besitzt, im Trennbereich von Sephadex G 200 und damit unter dem Molekulargewicht von 200.000. Der gleiche Phenol-Wasser-Extrakt wurde nun auf einer Sephadex G 100-Säule aufgetragen und mit Wasser eluiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 9 dargestellt. Es erschien nur noch der Ausschlußgipfel, während die Trennfraktion weggefallen ist, d.h., das an Sephadex G 200 isolierte Antigen wurde unter diesen Bedingungen nicht mehr abgetrennt, sondern lag in der Ausschlußfraktion vor.
Dieser Befund wurde auch immunelektrophoretisch bestätigt, da sich die Antigenaktivität lediglich im Bereich des Ausschlußgipfels fand.

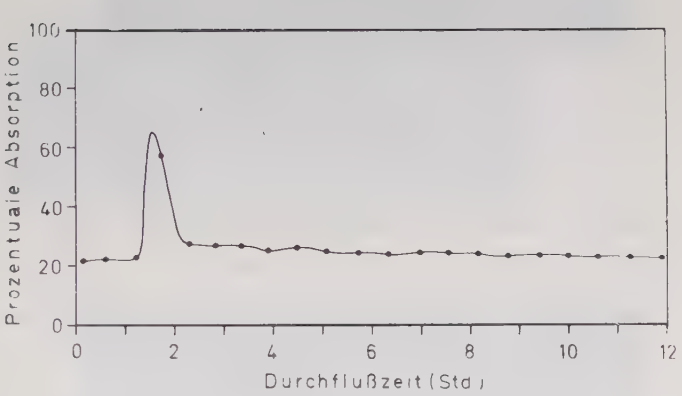

Abbildung 9: Durchflußdiagramm eines säulenchromatrographischen Trennversuches des Phenol-Wasser-Extraktes aus dem Zellinhalt von Candida tropicalis. Säulenfüllung Sephadex G 100. Elutionsmittel Wasser. Absorption bei 253 nm.

Abbildung 10: Immunelektrophorese mit Antiserum gegen Candida tropicalis
Oben: Isolierte Fraktion aus Candida tropicalis
Unten: Vollantigen Candida tropicalis

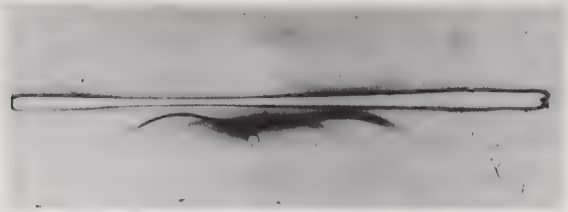

Abbildung 11: Immunelektrophorese mit Antiserum gegen Candida stellatoidea
Oben : Isolierte Fraktion aus Candida tropicalis
Unten: Vollantigen Candida stellatoidea

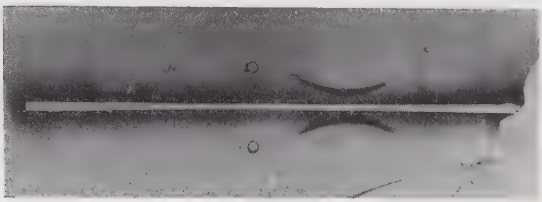

Abbildung 12: Immunelektrophorese mit Antiserum gegen Candida krusei
Oben und unten: Isolierte Fraktion aus Candida tropicalis

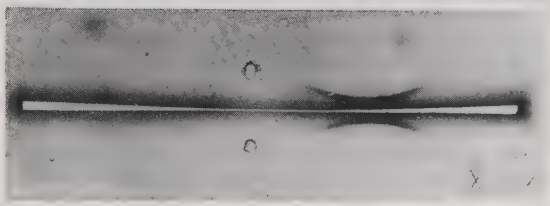

Abbildung 13: Immunelektrophorese mit Antiserum gegen Candida torulopsis glabrata
Oben und unten: Isolierte Fraktion aus Candida tropicalis

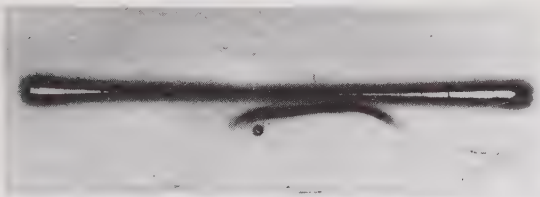

Abbildung 14: Immunelektrophorese mit Antiserum gegen Saccharomyces rouxei
Oben: Isolierte Fraktion aus Candida tropicalis
Unten: Vollantigen Saccharomyces rouxei

IV. D I S K U S S I O N

Der in dieser Arbeit unternommene Versuch, ein einzelnes Antigen aus Zellinhalt von Sproßpilzen zu isolieren und damit die Bildung eines monospezifischen Antiserums zu induzieren, führte zu den in Abbildung 15 dargestellten Ergebnissen. Daraus geht hervor, daß die ursprünglich vorhandene Immunogenität des Phenol-Wasser-Extraktes durch die für die Färbung der Polysaccharide notwendigen Reinigungsschritte verloren geht, während die serologische Aktivität in der Immunelektrophorese bestehen bleibt. Bei der Phenol-Wasser-Extraktion werden die im Zellinhalt vorkommenden, zur Anode wandernden Eiweißantigene denaturiert und verbleiben in der Phenolphase. Es ist anzunehmen, daß bei der Eiweißfällung mit Sulfosalizylsäure (etwa 50 %) die Glykoproteine erfaßt werden. Die Überprüfung des Niederschlages in der Immunelektrophorese ergab tatsächlich eine zur Kathode wandernde serologische Aktivität, die nach MÜLLER und HIRSCH (1967) nur Glykoproteine enthält. Ein weiterer Verlust trat durch die Abtrennung der Nukleinsäuren ein; auch hier wurde serologisch aktives Material mit-

gefällt. Der Verlust der Immunogenität könnte also entweder auf der Bindung mit dem Farbstoff oder der Entfernung der noch an Eiweißträger gebundenen Polysaccharide beruhen. Die erste Möglichkeit kann wohl ausgeschlossen werden, da in vitro die serologische Aktivität durch die Färbung nicht beeinträchtigt wird.

Nach dieser Erfahrung wurde versucht, ob sich auch ohne Anfärbung - also auch ohne Reinigungsschritte - der Phenol-Wasser-Extrakt säulenchromatographisch auftrennen läßt. Die Untersuchungen führten zu analogen Ergebnissen wie nach Reinigung und Färbung der Polysaccharide. Die Immunisierungsversuche wurden dann mit dem Einzelantigen fortgeführt. Es konnte jedoch auch nach dieser schonenderen Aufarbeitung kein Antikörper induziert werden.

Die Tatsache, daß sich dieses Einzelantigen in der Agargelelektrophorese nur mit 90 %-igem Aethylalkohol und nicht, wie die Glykoproteine, mit Methanol-Eisessig fixieren ließ, spricht ebenso wie die alleinige Anfärbbarkeit mit PAS dafür, daß bei dem Siebeffekt des Sephadex G 200 ein Polysaccharid von den Glykoproteinen abgetrennt wird.

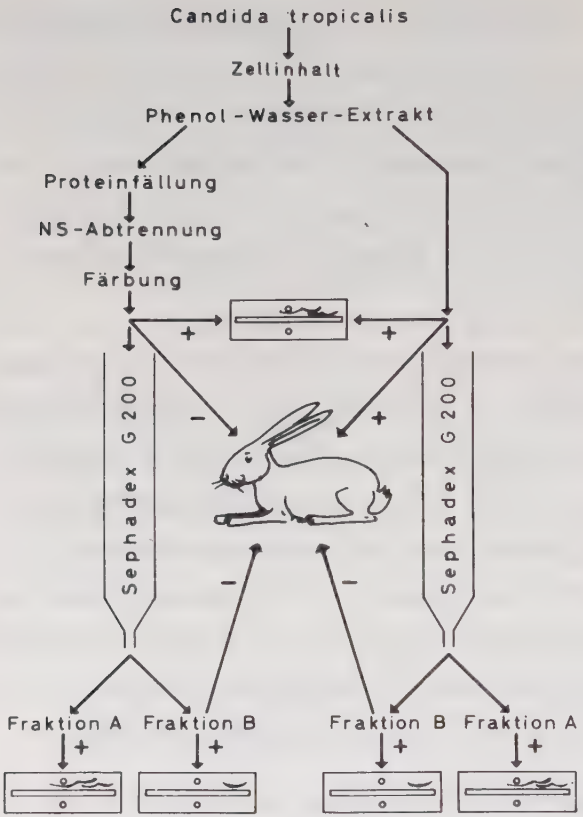

Abbildung 15: Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse von Immunelektrophorese und Immunisierungsversuchen mit den aufgearbeiteten Phenol-Wasser -Extrakten aus Zellinhalt von Candida tropicalis

Auch die Bindung an Latexpartikel führt nicht zur immunogenen Wirkung (möglicherweise wird das Polysaccharid in vivo wieder abgspalten), ebenso erfolglos war auch die Verwendung von Freund'schem Adjuvans.

Der Einwand, daß die ausgebliebene Antikörperbildung auf einer individuellen Eigenschaft der Kaninchen beruht, entfällt jedoch, da die beiden Tiere später bei Immunisierung mit aktivem Extrakt eine gute Antikörperproduktion aufwiesen.

So muß angenommen werden, daß das Polysaccharid nur in Verbindung mit einem Eiweißträger - vielleicht sogar einem bestimmten Eiweiß - immunogen wirkt, wie man es ja von einigen Arzneimitteln und durch sie hervorgerufene Allergien kennt.

Das isolierte Polysaccharid ist nicht spezifisch für Candida tropicalis, sondern reagiert auch mit Antiserum gegen eine Reihe von anderen Sproßpilzarten. Diese Feststellung kann für den Antikörpernachweis bei Patienten besondere Bedeutung erlangen. Mit diesem Antigen ist es möglich, z.B. im indirekten Hämagglutinationstest, entsprechende Antikörper

gegen die am häufigsten als Erreger vorkommenden Candida-Arten zu erfassen und damit eine Sproßpilzinfektion zu diagnostizieren. Es sind dann Serumverdünnungsreihen für die Prüfung mit verschiedenen Sproßpilzen entbehrlich.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Imperfekte Hefen besitzen zahlreiche Antigene nicht nur an der Zellwand, sondern auch im Zellinhalt. Hieraus sollte ein Polysaccharidantigen isoliert und dagegen ein monospezifisches Antiserum produziert werden, um die Frage prüfen zu können, ob eine entsprechende Antigengemeinschaft zwischen verschiedenen pathogenen Sproßpilzarten besteht.

Aus dem Zellinhalt der fakultativ-pathogenen Hefe Candida tropicalis (CBS_{94}) konnten mit Hilfe der Phenol-Wasser-Extraktion verschiedene, serologisch aktive Polysaccharide gewonnen werden. Um sie nach Aufarbeitung wiederzufinden, erfolgte eine Anfärbung mit Remazoltürkisblau, die jedoch zuvor eine Reinigung von Nukleinsäuren und Eiweiß voraussetzt. Hierbei ging die Immunogenität verloren, während die serologische Aktivität unverändert erhalten blieb.

Es wurde deshalb versucht, das Einzelantigen direkt aus dem antigen wirksamen Rohextrakt der wässrigen Phase der Phenolextraktion ohne vorherige chemische Trennung zu gewinnen. Die Isolierung erfolgte durch Gelfiltration über Sephadex G-200, wobei die Polysaccharide durch ihre Eigenabsorption bei 253 nm identifiziert und serologisch charakterisiert wurden.

Es konnte eine in der Immunelektrophorese als Einzelantigen reagierende, serologisch aktive Substanz

dargestellt werden, die selbst bei Zusatz von Freund'-schem Adjuvans oder Aluminiumhydroxyd keine Antikörper zu induzieren vermochte. Es dürfte sich demnach um ein Hapten gehandelt haben, das - wie der Rohextrakt zeigt- nur in Verbindung mit einem Eiweißträger immunogen wirkt.

Das isolierte Polysaccharid reagierte spezifisch in der Immunoelektrophorese mit Antiseren gegen zahlreiche pathogene Sproßpilzarten, was auf eine entsprechende Antigengemeinschaft hinweist. So ermöglicht dieses Polysaccharidantigen den Antikörpernachweis im Serum Mykosekranker. Dieses Verfahren dürfte als Suchtest die Diagnose von Erkrankungen durch imperfekte Hefen erleichtern.

VI. L I T E R A T U R

AKIBA, T., IWATA, K. and S. INOUE: Studies on the serologic diagnosis of Candidiasis. In Studies on the Candidiasis in Japan 65 (1965), Research Committee of Candidiasis, Education Ministry.

BRAUDE, A.I. and J.A. ROCK: The syndrome of acute disseminated moniliasis in adults. Arch. Int. Med. 104 (1959) 91.

BÜRGER, H. and H.-L. Müller: Markierung von antigenen Polysacchariden mit Vinylsulfofarbstoffen. Naturwissensch. 5 (1964) 463.

CONN, N.K., CREAN, G.P. and A.F.MACCABE: Systemic candidiasis and endocarditis due to C. tropicalis. Brit. Med. J. 1 (1959) 944.

FOLB, P.I. and J.R. TROUNCE: Immunological aspects of Candida infection complication and immunsuppressive drug therapy. Lancet 1970, 1112.

GRABAR,P. et C.A.WILLIAMS: Méthode immunoélectrophoretique d-analyse de mélanges du substances antigéniques.
Biochim. Biophys. Acta 17 (1955) 64

GERLOCZY,F., SCHMIDT,K. und M.SCHOLZ: Beiträge zur Frage der Moniliasis im Säuglingsalter.
Ann. Pediat. 187 (1956) 119

LOURIA,D.B. and P.DINEEN: Amphotericin B in treatment of disseminated moniliasis.
J. Amer. Med. Ass. 174 (1960) 273

LUTZ, A., GROOTTEN,O. et M.A. WITZ: Etude sur des champignons levuriformes du genre Candida leur frequence l'action de la Mycostatine et de la Trichomycine.
Rev. d'immunol. 21 (1957) 237

MANKOWSKY, Z.T.: The influence of humoral conditions on the experimental fungus infection.
In T.H.Sternberg and V.D. Newcomer (Ed.), Therapy of fungus diseases. Little, Brown and Co., Boston 1955

MARKOWITZ,A.S. and J.S. HENDERSON: A rapid and specific method for the isolation of pneumococcal polysaccharide.
Nature 181 (1958) 771

MATHIAS, J.Q. and E.G. REES: Candida septicemia complicating antibiotic therapy.
J. Path. Bact. 71 (1956) 512

MICHAELIS, L.: Der Acetat-Veronal-Puffer.
Biochem. Z. 234 (1931) 139

MÜLLER, H.-L. und M. HIRSCH: Zur Antigenstruktur von Candida albicans und tropicalis.
IV. Mitteilung: Immunelektrophoretische Antigenstudien an Zellmembran und Zellinhalt.
Zbl. Bakt. I. Orig. 202 (1967) 247

O'GRADY, F., COTTON, R.E. and R.E.M. THOMSON : Morphology of cortison-induced changes in mouse thigh candidiasis.
Brit. J. exp. Pathol. 45 (1964) 656

PRIEBE, P.: Untersuchungen über die Gelfiltration gefärbter, serologisch aktiver Polysaccharide von Candida albicans und Candida tropicalis mit Sephadex. Inaugural-Dissertation, Marburg 1967

RICHERT, G., DROUHET, E., DUCROT, H. et P. JUNGERS : Guérison de deux cas de septicémie à Candida albicans compliquant une anurie grave. Action de l'amphotéricine B. Bull. et mém. hop. Paris 75 (1959) 780

RIFKIND, D., MARCHIORO, T.L., SCHNECK, S.A. and R.B.Jr. HILL : Systemic fungal infections complicating renal transplantation and immunosuppressive therapy. Clinical, microbiological and pathologic features. Am. J. Med. 43 (1967) 28

SCHEIDEGGER, J.J.: Une micro-méthode de l'immuno-electrophorèse. Int. Arch. Allergy 7 (1955) 103

SEELIG, M.S.: Mechanismen by which antibiotisis increase the incidence and severity of candidiasis and alter the immunological defenses.
Bact. Rev. 30/2 (1966) 442

TSUCHIYA, T., FUKAZAWA, Y., MIYASAKI, F. and S. KAWAKITA: Studies on the classification of the genus Candida III.
Jap. J. Exp. Med. 25 (1955) 75

TSUCHIYA, T., FUKAZAWA, Y. and S. KAWAKITA : Serological classification of the genus Candida. In "Studies on the Candidiasis in Japan", Res. Committee of Candidiasis, Education Ministry of Japan 1961, 34

TSUCHIYA, T., MIYASAKI, F. and Y. FUKAZAWA: Studies on the classification of the genus Candida II.
Jap. J. Exp. Med. 25 (1955) 15

VERGEZ, J. et R. SIMON: Pyonéphrose a "Monilia albicans".
Mem. Acad. Chir. 79 (1953) 422

WESTPHAL, O., LÜDERITZ, O. und F. BISTER : Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol-Wasser.

Z. Naturforsch. 7b (1952) 148

Herrn Prof. Dr. med. R. S i e g e r t ,
dem Direktor des Hygiene-Instituts, danke ich
für die Überlassung des Themas und des
Arbeitsplatzes.

Frau Privatdozentin Dr.med. H.-L. M ü l l e r
habe ich für fachlichen Rat, Hilfsbereitschaft
und manche Anregung zu danken.

L E B E N S L A U F

Als Sohn des Hauptlehrers Hans Sauerwein und dessen Ehefrau Henny, geb. Rehbein, wurde ich, Dieter, Heinrich Sauerwein, am 1.12.1940 in Marburg/Lahn geboren.
Am 16.2.1961 beendete ich meine Schulzeit am Realgymnasium Hess.-Lichtenau mit der Reifeprüfung. Mein Medizinstudium begann ich im Wintersemester 1961/62 an der Philipps-Universität in Marburg. Hier legte ich am 27.10.1962 das Vorphysikum, am 21. 4. 1964 das Physikum und am 2.8.1967 das Staatsexamen ab.

Meine Medizinalassistentenzeit absolvierte ich am DRK-Krankenhaus in Biedenkopf/Lahn und am Evangelischen Johanneskrankenhaus in Versmold/Westfalen (1.9.1967 bis 28.2.1968 und 1.3.1968 bis 30.8.1969).

Vom 1.10.1969 bis 30.9.1971 arbeitete ich am Kreiskrankenhaus Rotenburg/Fulda als Assistenzarzt an der chirurgischen Abteilung des Hauses.

Seit 1.11.1971 bin ich wissenschaftlicher Angestellter an der Urologischen Universitäts-Klinik Marburg.

Meine akademischen Lehrer waren die
Herren Professoren und Dozenten:

Ammon, Beckmann, Berendes, Bommer,
Braun-Falco, Buchholz, Bücher, Dimroth,
Drawert, du Mesnil de Rochemont, Exner,
Gedigk, Hamm, Hardewig, Hensel, Heuser,
Hildebrand, Hohorst, Jacob, Klingenberg,
Knauf, Lang, Linneweh, Löhr, Mahr, Mann,
Martini, Marx, Neubauer, Niessing, Petri,
Potz, Rodeck, Rohen, Salfeld, Schiff,
Schleyer, Siegert, Siess, Schrappe, Schmied,
Schultze, Schwaiger, Seidel, Straub, Streicher,
Voigt, Walcher, Würtele.